

25 動物遺伝資源の特性評価のためのマイクロサテライト DNA の効率的単離法

【要約】動物遺伝資源の特性評価に資するため、マイクロサテライト DNA のゲノム中コピー数が少ない家禽において、pCR-Script ベクター、点変異導入法および mung bean ヌクレアーゼを組み合わせることによってその効率的単離法を開発した。

| | | | | | | | |
|-------------------------------|----|----|----|----|-----|-----|--------------|
| 農業生物資源研究所 遺伝資源第一部 動物探索評価研究チーム | | | | | | 連絡先 | 0298-38-7041 |
| 部会名 | 畜産 | 専門 | 育種 | 対象 | 家禽類 | 分類 | 研究 |

【背景・ねらい】

マイクロサテライト DNA は、数塩基の配列が繰り返しているもので、その代表として CA リピートがある。マイクロサテライト DNA は、各染色体に広く分布し、対立遺伝子 (allele) 数が多いことから遺伝子マーカーとして哺乳動物の遺伝解析に広く用いられている。ところが家禽においては、既知のマイクロサテライト DNA マーカーは少ない。また、家禽のマイクロサテライト DNA の 1 ゲノムあたりのコピー数は、哺乳動物の約 10 分の 1 と少なく、これまでの方法では新たなマイクロサテライト DNA のクローニングにかなりの時間と労力を要する。本研究では、マイクロサテライト DNA を応用した動物遺伝資源の遺伝特性評価に資するため、マイクロサテライト DNA の効率的なクローニング法を開発する。

【背景・ねらい】

1. 点変異導入法 (Kunkel ら, 1988) の操作手順を哺乳動物のマイクロサテライト DNA のクローニングに応用した方法 (Ostrander ら, 1992) を改変し、家禽のマイクロサテライト DNA の効率的なクローニング法を開発した (図 1)。
2. その結果、Ostrander (1992) の方法をそのまま家禽に応用した場合より、30 倍以上効率的にマイクロサテライト DNA を単離できる (表 1)。
3. この方法では、PCR 産物クローニング用に開発されたプラスミドベクター pCR-Script (Stratagene) を使用することにより、脱リン酸化処理を施した DNA 断片のクローニング効率を上げ、さらに大腸菌 XL 1-Blue MRF' を使用することによって形質転換効率を上げた。これによって、プライマー伸長反応に供与するクローン数を飛躍的に増加させた。
4. CA リピートを含むクローンを選択する目的で、調製した一本鎖 DNA、(CA)₁₀ オリゴヌクレオチド、dNTP、耐熱性ポリメラーゼを混合し、高温下でプライマー伸長反応を行った。その後、一本鎖 DNA 特異的分解酵素である mung bean ヌクレアーゼを作用させることで、二本鎖 DNA を効率的に選別することを可能にした。

【成果の活用面・留意点】

本法で単離されたマイクロサテライト DNA は、家禽遺伝資源の特性評価に利用できる。また本法は、他の動物種においてもマイクロサテライト DNA の効率的クローニング法として応用できる。

[具体的データ]

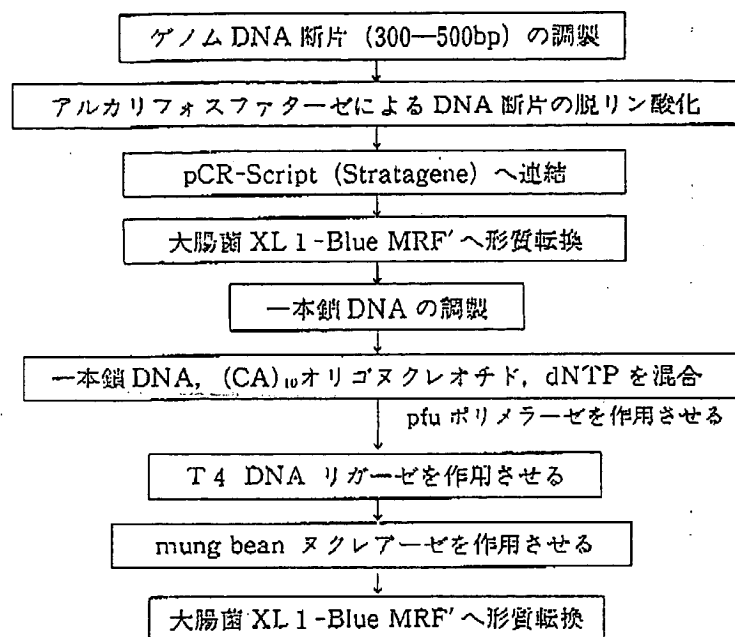


図1 マイクロサテライト DNA のクローニング手順

表1 従来法との効率比較

| | 今回の方法 | Ostrander らの方法* |
|------------------------------|-------|-----------------|
| (CA) ₁₀ 陽性クローンの割合 | 70% | 2.1% |
| 平均 CA 繰り返し回数 | 13.3回 | 7.8回 |

(* Cheng & Crittenden, 1994)

[その他]

研究課題名：動物遺伝資源評価のための DNA 多型マーカーの開発

予算区分：経常

研究期間：平成7年度（平成6～8年度）

研究担当者：高橋秀彰，葦澤圭二郎，古川 力

発表論文等：1) Takahashi *et al.*: Efficient cloning method to detect micro-satellite markers in chickens. 第20回ベルツビルシンポジウム講演要旨, p32 (1995)
 2) 高橋秀彰ら：多型 DNA マーカーの効率的クローニング法の検討. 第90回日本畜産学会大会講演要旨, p177 (1995)
 3) 高橋秀彰ら：ニワトリのマイクロサテライト DNA マーカー単離の効率化. 平成7年度日本家禽学会秋季大会講演要旨, p11 (1995)